(19) Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets

(11) Veröffentlichungsnummer: **0 217 197**
A2

(12) EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(21) Anmeldenummer: **86112620.9**

(51) Int. Cl.⁴: **G01N 33/72** , G01N 31/22

(22) Anmeldetag: **12.09.86**

(30) Priorität: **26.09.85 CH 4172/85**

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:
08.04.87 Patentblatt 87/15

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE FR GB IT LI NL SE

(71) Anmelder: **F. HOFFMANN-LA ROCHE & CO. Aktiengesellschaft**

CH-4002 Basel(CH)

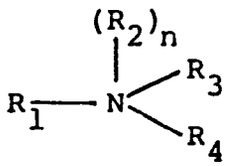
(72) Erfinder: **Le Dain, Michel, Dr.**
10 rue Jean Schoerlin Neuwiller
F-68220 Hegenheim(FR)

(74) Vertreter: **Kloter, Rudolf et al**
Postfach 3255 Grenzacherstrasse 124
CH-4002 Basel(CH)

(54) Bestimmung von Bilirubin und entsprechende Reagentien.

(57) Es werden ein Verfahren zur Bestimmung von Gesamt-Bilirubin in einer biologischen Probe nach der Diazomethode sowie hierfür geeignete Reagenzien beschrieben.

Diese Methode besteht darin, dass man bei der Billirubin-Bestimmung ein oder mehrere Detergenzien der allgemeinen Formel



I

worin R_1, R_2, n, R_3 und R_4 die in Anspruch 1 erwähnte Bedeutung haben, verwendet.

Die Methode gemäss vorliegender Erfindung zur Bestimmung von Bilirubin gewährt eine höhere Linearität, eine günstigere Kinetik der Reaktion, die die Anwendung des Autoblanking-Systems erlaubt, eine einfachere Reagenzienzubereitung, eine lange Gebrauchslösungsstabilität und eine gute Reproduzierbarkeit.

Ein ganz besonders bevorzugtes Detergenz der allgemeinen Formel I ist Dodecyläthyldimethylammoniumbromid.

Die Reagenzien zur Bestimmung von Bilirubin gemäss vorliegender Erfindung können in wässriger Lösung oder bevorzugt in stabilisierter und lyophilisierter Form vorliegen.

EP 0 217 197 A2

Bestimmung von Bilirubin und entsprechende Reagentien

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung von Gesamt-Bilirubin in einer biologischen Probe nach der Diazomethode sowie hierfür geeignete Reagenzien.

Die Bestimmung von Gesamt-Bilirubin nach der Diazomethode ist eine dem Fachmann bestens bekannte Technik. Allerdings weisen diese Methode sowie die hierfür verwendeten Reagenzien einige Nachteile auf, insbesondere war es bis heute nicht möglich, diese Methode in Analysenautomaten nach dem sogenannten Autoblanking-Verfahren durchzuführen.

Die Methode gemäss vorliegender Erfindung bzw. die hierfür vorgesehenen Reagenzien ergeben einen Test, der sich durch die nachfolgenden überraschenden Vorteile auszeichnet:

-höhere Linearität

-günstige Kinetik der Reaktion, die die Anwendung des Autoblanking-Systems erlaubt

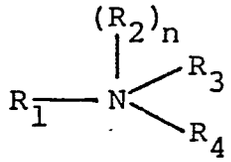
-einfachere Reagenzienzubereitung

-lange Gebrauchslösungsstabilität und

-gute Präzision und gute Reproduzierbarkeit.

Bekanntlich besteht ja die Diazomethode zur Bestimmung von Bilirubin darin, dass das in der biologischen Probe enthaltene Bilirubin mit einer Diazonium-Verbindung zu einem Farbstoff reagiert, dessen Intensität der Menge an Bilirubin in der Probe entspricht.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurde nun überraschend gefunden, dass die oben erwähnten Vorteile erzielt werden können, wenn man bei der Bilirubin-Bestimmung nach der Diazomethode ein oder mehrere Detergenzien der allgemeinen Formel



I

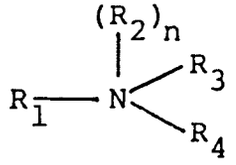
worin R_1 gerades oder verzweigtes Alkyl mit 10-16 C-Atomen bedeutet, R_2 Sauerstoff oder gerades oder verzweigtes Alkyl mit 1-4 C-Atomen bedeutet; R_3, sofern n = 0 ist, Wasserstoff oder gerades oder verzweigtes Alkyl mit 1-4 C-Atomen oder -$(CH_2\text{-}CH_2\text{-}O)_xH$ bedeutet, wobei x eine ganze Zahl von 1-5 ist, R_3, sofern n = 1 und R_2 Sauerstoff bedeutet, gerades oder verzweigtes Alkyl mit 1-1 C-Atomen oder -$(CH_2\text{-}CH_2\text{-}O)_xH$ bedeutet, wobei x eine ganze Zahl von 1-5 ist, R_3, sofern n = 1 und R_2 gerades oder verzweigtes Alkyl mit 1-4 C-Atomen bedeutet, gerades oder verzweigtes Alkyl mit 1-4 C-Atomen bedeutet; R_4, sofern n = 0 ist, Wasserstoff oder gerades oder verzweigtes Alkyl mit 1-4 C-Atomen oder -$(CH_2\text{-}CH_2\text{-}O)_xH$ bedeutet, wobei x eine ganze Zahl von 1-5 ist, R_4, sofern n = 1 und R_2 Sauerstoff bedeutet, gerades oder verzweigtes Alkyl mit 1-4 C-Atomen, oder -$(CH_2\text{-}CH_2\text{-}O)_xH$ bedeutet, wobei x eine ganze Zahl von 1-5 ist, R_4, sofern n = 1 und R_2 gerades oder verzweigtes Alkyl mit 1-4 C-Atomen, gerades oder verzweigtes Alkyl mit 1-10 C-Atomen bedeutet; oder R_2, R_3 und R_4 zusammen mit dem Stickstoffatom eine Pyridiniumgruppe bilden, wobei in diesem Fall, sowie im Falle, dass n = 1 und R_2 gerades oder verzweigtes Alkyl mit 1-4 C-Atomen bedeutet, ein entsprechendes Anion vorhanden ist,

verwendet.

Bevorzugte Detergenzien (im nachfolgenden auch als Acceleratorreagenzien bezeichnet) der Formel I sind N,N-Dimethyl-decylamin, N,N-Dimethyl-dodecylamin, N,N-Dimethyl-tetradecylamin, N,N-dimethyl-hexadecylamin, Didecyldimethylammoniumchlorid, Dodecyltrimethylammoniumchlorid, Dodecyltrimethylammoniumbromid, Dodecyläthyldimethylammoniumbromid, Dodecylpyridiniumchlorid, Tetradecyltrimethylammoniumbromid sowie N,N-Dimethyldodecylaminoxid. Ein ganz besonders bevorzugtes Detergenz der allgemeinen Formel I ist Dodecyläthyldimethylammoniumbromid.

Nach einem ersten Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung ein wässriges Reagenz zur Bestimmung von Gesamt-Bilirubin in einer biologischen Probe enthaltend einerseits

a) ein oder mehrere Detergenzien der allgemeinen Formel



I

worin R_1 gerades oder verzweigtes Alkyl mit 10-16 C-Atomen bedeutet, R_2 Sauerstoff oder gerades oder verzweigtes Alkyl mit 1-4 C-Atomen bedeutet; R_3, sofern n = 0 ist, Wasserstoff oder gerades oder verzweigtes Alkyl mit 1-4 C-Atomen oder $-(CH_2-CH_2-O)_xH$ bedeutet, wobei x eine ganze Zahl von 1-5 ist, R_3, sofern n = 1 und R_2 Sauerstoff bedeutet, gerades oder verzweigtes Alkyl mit 1-4 C-Atomen oder $-(CH_2-CH_2-O)_xH$ bedeutet, wobei x eine ganze Zahl von 1-5 ist, R_3, sofern n = 1 und R_2 gerades oder verzweigtes Alkyl mit 1-4 C-Atomen bedeutet, gerades oder verzweigtes Alkyl mit 1-4 C-Atomen bedeutet; R_4, sofern n = 0 ist, Wasserstoff oder gerades oder verzweigtes Alkyl mit 1-4 C-Atomen oder $-(CH_2-CH_2-O)_xH$ bedeutet, wobei x eine ganze Zahl von 1-5 ist, R_4, sofern n = 1 und R_2 Sauerstoff bedeutet, gerades oder verzweigtes Alkyl mit 1-4 C-Atomen, oder $-(CH_2-CH_2-O)_xH$ bedeutet, wobei x eine ganze Zahl von 1-5 ist, R_4, sofern n = 1 und R_2 gerades oder verzweigtes Alkyl mit 1-4 C-Atomen, gerades oder verzweigtes Alkyl mit 1-10 C-Atomen bedeutet; oder R_2, R_3 und R_4 zusammen mit dem Stickstoffatom eine Pyridiniumgruppe bilden, wobei in diesem Fall, sowie im Falle, dass n = 1 und R_2 gerades oder verzweigtest Alkyl mit 1-4 C-Atomen bedeutet, ein entsprechendes Anion vorhanden ist,

b) eine aromatische Aminoverbindung, die sich mit Nitrit in eine bei der Bilirubinbestimmung übliche Diazoniumverbindung überführen lässt,

c) eine starke Säure, und andererseits

d) eine wässrige Nitritlösung.

Nach einem zweiten Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung ein wässriges Reagenz zur Bestimmung von Gesamt-Bilirubin in einer biologischen Probe enthaltend

a) ein oder mehrere Detergenzien der allgemeinen Formel I,

b) eine bei der Bilirubinbestimmung übliche Diazoniumverbindung und

c) eine starke Säure.

In den vorerwähnten wässrigen Reagenzien ist das Detergenz der allgemeinen Formel I bevorzugt in einer Konzentration von 0,25-10%, insbesondere in einer Konzentration von 1-3% vorhanden.

Die aromatische Aminoverbindung ist bevorzugt in einer Konzentration von 0,5-40 mM, besonders bevorzugt in einer Konzentration von 1-30 mM vorhanden.

Als bevorzugte starke Säuren kommen Amidoschwefelsäure, Salzsäure sowie Schwefelsäure in Betracht.

Die Konzentration an Amidoschwefelsäure liegt vorzugsweise im Bereich von 0,025-1 M/l, insbesondere in einem Bereich von 0,10-0,25 M/l und der pH des Reagenz ist vorzugsweise zwischen 1 und 3.

Bei Verwendung von Salzsäure ist die Konzentration bevorzugt im Bereich von 0,01-0,5 M/l, insbesondere im Bereich von 0,05-0,2 M/l, und der pH des Reagenz ist vorzugsweise 1-3.

Bei Verwendung von Schwefelsäure liegt die Konzentration vorzugsweise im Bereich von 0,01-0,5 M/l, insbesondere im Bereich von 0,05-0,25 M/l und der pH des Reagenz ist vorzugsweise zwischen 1 und 3.

Die aromatische Aminoverbindung, die sich mit der Nitritlösung zur entsprechenden Diazoniumverbindung umsetzen lässt, ist vorzugsweise 4-Aminobenzolsulfonsäure, 2,4-oder 2,5-Dichloranilin, 4-Nitroanilin, 2-Methoxy-4-nitroanilin oder 2-Methoxy-5-nitroanilin.

Die vorerwähnte Nitritlösung ist vorzugsweise in einer Konzentration von 4-100 mM/l vorhanden.

Sofern das Reagenz bereits die fertige Diazoniumverbindung enthält, handelt es sich hierbei vorzugsweise um diazotierte Aminobenzolsulfonsäure oder diazotiertes 2,4-oder 2,5-Dichloranilin oder diazotiertes 4-Nitroanilin oder 2-Methoxy-4-nitroanilin oder 2-Methoxy-5-nitroanilin.

Die Konzentration an Diazoniumverbindung in der wässrigen Lösung liegt vorzugsweise im Bereich von 0,10-5,0 g/l, insbesondere in einer Konzentration von 0,15-3,0 g/l.

Die bevorzugten Detergenzien der allgemeinen Formel I wurden bereits eingangs erwähnt, doch kann hierzu noch bemerkt werden, dass die Substituenten R_3 und R_4 in der allgemeinen Formel I bevorzugt die gleiche Bedeutung haben.

Nach einem dritten Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung ein stabilisiertes und lyophilisiertes Reagenz zur Bestimmung von Gesamt-Bilirubin in einer biologischen Probe enthaltend diazotierte Aminobenzolsulfonsäure, diazotiertes 4-Nitroanilin, 2-Methoxy-4-nitroanilin, 2-Methoxy-5-nitroanilin, 2,4-Dichloranilin oder 2,5-Dichloranilin, sowie ein oder mehrere Detergentien der allgemeinen Formel I.

Nach einem vierten Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Bestimmung von Gesamt-Bilirubin in einer biologischen Probe nach der Diazomethode bei stark saurem pH, dadurch gekennzeichnet, dass ein oder mehrere Detergentien der allgemeinen Formel I verwendet werden.

Nach einem fünften Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung eines Detergenz der allgemeinen Formel I in einem Verfahren zur Bestimmung von Gesamt-Bilirubin nach der Diazomethode bei stark saurem pH in einer biologischen Probe.

Nach einem sechsten Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Bestimmung von Gesamt-Bilirubin in einer biologischen Probe nach der Diazo-Methode bei stark saurem pH nach dem Autoblanking-Verfahren, dadurch gekennzeichnet, dass ein oder mehrere Detergenzien der allgemeinen Formel I verwendet werden.

Die nachfolgenden Beispiele erläutern die Erfindung:

Beispiel 1

-Reagenslösungen:

Die Reagenslösung 1 enthält 20 g Dodecyläthyldimethylammoniumbromid und 5,195 g Sulfanilsäure aufgelöst in einem Liter 0,05 N Salzsäure. Das Reagens 2 ist eine 6,25 mmol wässrige Natriumnitritlösung. Das Reagens 1 wird mit Reagens 2 im Verhältnis 5 zu 1 gemischt. Nach 1 Minute bei RT ist das Reagensgemisch gebrauchsfertig.

-Testdurchführung auf Cobas-Bio®

Das Gebrauchsreagens wird mit Serum bzw. Bilirubinstandard bei einer determinierten Temperatur (25°C, 30°C oder 37°C), im Verhältnis 17,5:1 gemischt. Die Extinktion wird bei 550 nm genau nach 4,5 Sekunden und wieder nach 304,5 Sekunden gemessen.

-Auswertung :

-durch Vergleich der Extinktionsdifferenz mit einem Bilirubinstandard oder einem Kontrollserum:

$$\frac{(E_2P-E_1P)-RL}{(E_2S-E_1S)-RL} \times \text{Bilirubinkonzentration (S)}$$

P = Probe

S = Standard bzw. Kontrollserum.

Reagenzienleerwert (RL) wird systematisch vom Gerät gemessen und abgezogen.

- durch Faktor:

$$mg/dl = 18,09 \times \Delta E$$

$$\mu mol/l = 309 \times \Delta E$$

Die Abbildung 1 zeigt die Linearitätsprüfung mit einem hochkonzentrierten Bilirubinkontrollserum (42,8 mg/dl).

siehe Beispiel 1

Beispiel 2

-Reagenslösungen

-Testdurchführung: manuelles Vorgehen

In Küvetten (Schichtdicke 1 cm) werden bei Raumtemperatur die Reagenzienlösungen in der folgenden Weise pipettiert:

	Analyse (A)	Analyseleerwert (AL)
- Reagenslösung 1	-	1,0 ml
- Reagensgemisch	1,0 ml	-
- Probe	0,10 ml	0,10 ml

Es wird gut gemischt, worauf man das Gemisch während 10 Minuten bei RT stehen lässt. In den folgenden 60 Minuten werden die Extinktion der Probe gegen Analyseleerwert bei 546 nm oder 550 nm abgelesen.

Mit frischem Reagensgemisch (1 Tag bei RT oder 5 Tage bei 4°C) kann man den Reagenzienleerwert vernachlässigen.

-Auswertung

durch Vergleich der Extinktionsdifferenz mit Bilirubinstandard oder Kontrollserum:

$$\frac{E(A)-E(AL)}{E(S)-E(SL)} \times \text{Bilirubinkonzentration (S)}$$

durch Faktor = 12,4 x ΔE (mg/dl)
= 212 x ΔE (µmol/l).

Beispiel 3

-Reagenzien

-Lyophilisiertes Diazoreagens

In eine 25 mmol wässrige Amidoschwefelsäurelösung werden der Reihe nach aufgelöst:

4 g D-Mannit

1 g Dextran 32 und

2,4 g diazotierte Sulfanilsäure, Tetrafluoboratsalz.

Die Lösung wird auf 1 Liter aufgefüllt und für die Lyophilisation in 3 ml-Portionen verteilt. Wenn die Temperatur im Lyophilisator -40°C erreicht, wird das Vakuum (0,1 mm Hg) eingestellt. Dann werden die Platten bis 10°C unter Vakuum während ca. 16 Stunden erhitzt. Schliesslich wird das Lyophilisat während 2 Stunden bei 20°C unter Vakuum getrocknet.

-Acceleratorreagens

Zu einer 0,25 M wässrigen Amidoschwefelsäurelösung werden der Reihe nach zugeben:

75 ml Dodecyldimethylaminoxid (30% wässrige Lösung)

1 g Methylparaben und

25 g D-Mannit.

Die Lösung wird auf 1 Liter aufgefüllt.

Diese Lösung kann als flüssiges Reagens gebraucht werden oder, wie oben, nach Verteilung in 6 ml-Portionen, lyophilisiert werden.

-Gebrauchsreagenzien

Das lyophilisierte Diazoreagens wird in 3 ml entionisiertem Wasser aufgelöst. Sofern das Acceleratorreagens lyophilisiert ist, wird es in 6 ml entionisiertem Wasser aufgelöst.

-Testdurchführung auf Cobas Bio®

Die Acceleratorreagenslösung wird mit einer Serumprobe (P) oder einem Bilirubinstandard (S) bei einer determinierten Temperatur (25°C, 30°C oder 37°C) im Verhältnis 12,5:1 gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 10 Sekunden wird die Extinktion bei 550 nm gemessen (= Analyseleerwert). Dann werden 40 Mikroliter Diazorea-

genslösung in die Küvette zugegeben und die Extinktion nach 1 Sekunde und wieder nach 301 Sekunden abgelesen.

-Auswertung:

Durch Vergleich der Extinktionsdifferenz mit einem Bilirubinstandard bzw. mit einem Kontrollserum:

$$\frac{(E_2P-E_1P)-AL-RL}{(E_2S-E_1S)-SL-RL} \times \text{Bilirubinkonzentration (S)}$$

P = Probe

S = Standard

AL = Analyseleerwert, SL = Standardleerwert

RL = Reagenzienleerwert von Gerät systematisch gemessen und abgezogen.

- durch Faktor: 16,10 x ΔE für mg/dl
  275 x ΔE für µmol/l

-Abbildung 2:

Kinetik der Reaktion mit einer Verdünnungsreihe von Kontrollserumgemisch (40,4 mg Bilirubin/dl).

Beispiel 4

- Reagenzien
  - Lyophilisiertes Diazoreagens
  - Acceleratorreagens — siehe Beispiel 3

- Gebrauchsreagenzien: — siehe Beispiel 3

-Testdurchführung: manuelles Vorgehen.

In Küvetten (Schichtdicke 1 cm) werden bei Raumtemperatur die Reagenzienlösungen in der folgenden Weise pipettiert:

-Probe bzw. Standard: 0,10 ml

-Acceleratorreagenzlösung: 1,00 ml

gut mischen und Extinktion (E1) bei 546 nm oder 550 nm gegen Wasser ablesen.

-Diazoreagenslösung: 0,20 ml

gut mischen und nach 6 Minuten Extinktion (E2) gegen Wasser ablesen.

-Auswertung

-Durch Vergleich der Extinktionsdifferenz mit einem Bilirubinstandard bzw. mit einem Kontrollserum:

$$\frac{E_2P-E_1P}{E_2S-E_1S} \times \text{Bilirubinkonzentration (S)}$$

- durch Faktor: 16,3 x ΔE (mg/dl)
  279 x ΔE (µmol/l)

Richtigkeit mit Kontrollseren (Konzentration in mg/dl).

-Abbildung 3

Beispiel 5

-Reagenzien

- Lyophilisiertes Diazoreagenz
- Acceleratorreagenz

siehe Beispiel 3

-Gebrauchsreagenzien

-Sofern das Acceleratorreagenz lyophilisiert ist, wird es in 6 ml entionisiertem Wasser aufgelöst.
-Das Diazoreagens wird in 18 ml Acceleratorreagenzlösung aufgelöst.

-Testdurchführung auf Cobas Bio®

Das Gebrauchsreagens wird mit Serum bzw. Bilirubinstandard bei einer determinierten Temperatur (25°C, 30°C oder 37°C), im Verhältnis 17,5:1 gemischt. Die Extinktion wird genau nach 4,5 Sekunden bei 550 nm und wieder nach 304,5 Sekunden gemessen.

-Auswertung:

-Vergleich der Extinktionsdifferenz wie in Beispiel 3

-mit Faktor = 16,80 x ΔE (mg/dl)

= 287 x ΔE (µmol/l).

-Abbildung 4:

Kinetik der Reaktion mit der Verdünnungsreihe von einem Kontrollserumgemisch (40,4 mg/dl).

Beispiel 6

-Reagenzien

siehe Beispiel 5

-Testdurchführung: (manuelles Vorgehen)

In Küvetten (Schichtdicke 1 cm) werden bei Raumtemperatur die unten angegebenen Lösungen wie folgt pipettiert:

	Analyse (A)	Analyseleerwert (AL)
- Acceleratorreagenslösung	-	1,0 ml
- Gebrauchsreagenslösung	1,0 ml	-
- Serum bzw. Standard	0,10 ml	0,10 ml

Es wird gut gemischt, worauf nach 6 Minuten die Extinktion gegen die Extinktion (AL) bei 546 nm bzw. 550 nm abgelesen wird.

Für jede Serie wird ein Reagenzienleerwert gemessen (Gebrauchsreagenzlösung).

-Auswertung

-durch Extinktionsdifferenz mnit einem Standard

$$\frac{E(A)-E(AL)-RL}{E(S)-E(SL)-RL} \times \text{Bilirubinkonzentration (S)}$$

mit Faktor: 13,20 x ΔE (mg/dl)
226 x ΔE (µmol/l).

Recovery Studie mit Kontrollserumgemischen - (23-366 µmol/l).

Beispiel 7

-Lyophilisiertes Monoreagens

In eine 0,333 M wässrige Amidoschwefelsäure Lösung werden der Reihe nach zugegeben und gemischt

60 g Dodecyläthyldimethylammoniumbromid

3 g Dextran 32 und

1 g diazotierte Sulfanilsäure, Tetrafluoroboratsalz.

Die Lösung wird auf 1 Liter aufgefüllt und für die Lyophilisation in 2 ml-Portionen verteilt. Die Lyophilisation wird wie im Beispiel 3 beschrieben durchgeführt.

-Gebrauchsreagenz:

Das Lyophilisat wird in 6 ml entionisiertem Wasser aufgelöst. Dieses Reagenz ist für Analysenautomaten besonders günstig.

-Testdurchführung auf Cobas Bio®

wie im Beispiel 1 beschrieben.

-Auswertung:

-durch Vergleich mit Standard bzw. Kontrollserum siehe Beispiel 1

- Durch Faktor: 16,95 x ΔE (mg/dl)

290 x ΔE (µmol/l).

-Abbildung 5

Beispiel 8

Lyophilisiertes Monoreagens mit diazotiertem 2,4-Dichloranilin

-Lyophilisiertes Monoreagens

In eine 0,333 M wässrige Amidoschwefelsäurelösung werden der Reihe nach zugegeben und gemischt:

30 g Dodecyläthyldimethylammoniumbromid

6 g Dextran 32 und

1,4 g diazotiertes 2,4-Dichloranilin mit Naphthalindisulfonsäure-Natriumsalz stabilisiert.

Die Lösung wird auf 1 Liter aufgefüllt und für die Lyophilisation in 2 ml-Portionen verteilt (siehe Beispiel 3).

-Gebrauchsreagens

Das Lyophilisat wird in 6 ml entionisiertem Wasser aufgelöst.

- Testdurchführung auf Cobas-Bio®

wie in Beispiel 1 beschrieben

-Auswertung:

-durch Vergleich mit Standard bzw. Kontrollserum wie in Beispiel 1 beschrieben

-mit Faktor: 19,80 x ΔE (mg/dl)

- Abbildung 6:

Linearitätsprüfung mit einem hochkonzentrierten Bilirubinkontrollserum (37,7 mg/dl).

Beispiel 9

Lyophilisiertes Monoreagens mit diazotiertem 2,5-Dichloranilin

-Lyophilisiertes Monoreagens

In eine 0,333 M wässrige Amidoschwefelsäurelösung werden der Reihe nach zugegeben und gemischt:

30 g Dodecyläthyldimethylammoniumbromid

6 g Dextran 32 und

1,4 g diazotiertes 2,5-Dichloranilin mit Naphthalindisulfonsäure-Natriumsalz stabilisiert.

Die Lösung wird auf 1 Liter aufgefüllt und für die Lyophilisation in 2 ml-Portionen verteilt (siehe Beispiel 3).

-Gebrauchsreagens

Das Lysophilisat wird in 6 ml entionisiertem Wasser aufgelöst.

-Testdurchführung auf Cobas-Bio®

Das Gebrauchsreagens wird mit Serum bzw. Bilirubinstandard bei 25°C, im Verhältnis 17,5:1 gemischt. Die Extinktion wird bei 550 nm genau nach 4,5 Sekunden und wieder nach 304,5 Sekunden gemessen.

-Auswertung

-durch Vergleich der Extinktionsdifferenz mit einem Bilirubinstandard oder einem Kontrollserum

-durch Faktor: mg/dl = 21,11 * ΔE

µmol/l = 361 * ΔE.

Beispiel 10

Lyophilisiertes Monoreagens mit 4 Nitrobenzoldiazonium,tetrafluorboratsalz

-Lyophilisiertes Monoreagens

In eine 0,333 M wässrige Amidoschwefelsäurelösung werden der Reihe nach zugegeben und gemischt:

54 ml Dodecyldimethylamin

6 g Dextran 32

0,6 g 4 Nitrobenzoldiazonium,tetrafluorboratsalz

Die Lösung wird auf 1 Liter aufgefüllt und für die Lyophilisation in 2 ml-Portionen verteilt (siehe Beispiel 3).

-Gebrauchsreagens

Das Lyophilisat wird in 6 ml entionisiertem Wasser aufgelöst.

-Testdurchführung auf Coba-Bio®

Die Testdurchführung erfolgt wie in Beispiel 9.

-Auswertung

-durch Vergleich der Extinktionsdifferenz mit einem Bilirubinstandard oder einem Kontrollserum

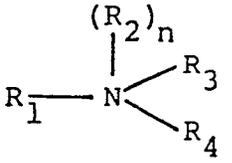
-durch Faktor: mg/dl = 18,44 * ΔE

µmol/l = 315,1 * ΔE.

Ansprüche

1. Wässriges Reagens zur Bestimmung von Gesamt-Bilirubin in einer biologischen Probe enthaltend einerseits

a) ein oder mehrere Detergenzien der allgemeinen Formel



I

worin R_1 gerades oder verzweigtes Alkyl mit 10-16 C-Atomen bedeutet, R_2 Sauerstoff oder gerades oder verzweigtes Alkyl mit 1-4 C-Atomen bedeutet; R_3, sofern n = 0 ist, Wasserstoff oder gerades oder verzweigtes Alkyl mit 1-4 C-Atomen oder -$(CH_2$-CH_2-$O)_x$)H bedeutet, wobei x eine ganze Zahl von 1-5 ist, R_3, sofern n = 1 und R_2 Sauerstoff bedeutet, gerades oder verzweigtes Alkyl mit 1-4 C-Atomen oder -$(CH_2$-CH_2-$O)_x$H bedeutet, wobei x eine ganze Zahl von 1-5 ist, R_3, sofern n = 1 und R_2 gerades oder verzweigtes Alkyl mit 1-4 C-Atomen bedeutet, gerades oder verzweigtes Alkyl mit 1-4 C-Atomen bedeutet; R_4, sofern n = 0 ist, Wasserstoff oder gerades oder verzweigtes Alkyl mit 1-4 C-Atomen oder -$(CH_2$-CH_2-$O)_x$H bedeutet, wobei x eine ganze Zahl von 1-5 ist, R_4, sofern n = 1 und R_2 Sauerstoff bedeutet, gerades oder verzweigtes Alkyl mit 1-4 C-Atomen, oder -$(CH_2$-CH_2-$O)_x$H bedeutet, wobei x eine ganze Zahl von 1-5 ist, R_4, sofern n = 1 und R_2 gerades oder verzweigtes Alkyl mit 1-4 C-Atomen, gerades oder verzweigtes Alkyl mit 1-10 C-Atomen bedeutet; oder R_2, R_3 und R_4 zusammen mit dem Stickstoffatom eine Pyridiniumgruppe bilden, wobei in diesem Fall, sowie im Falle, dass n = 1 und R_2 gerades oder verzweigtes Alkyl mit 1-4 C-Atomen bedeutet, ein entsprechendes Anion vorhanden ist,

b) eine aromatische Aminoverbindung, die sich mit Nitrit in eine bei der Bilirubinbestimmung übliche Diazoniumverbindung überführen lässt,

c) eine starke Säure, und andererseits

d) eine wässrige Nitritlösung.

2. Wässriges Reagens zur Bestimmung von Gesamt-Bilirubin in einer biologischen Probe enthaltend

a) ein oder mehrere Detergenzien der allgemeinen Formel I,

b) eine bei der Bilirubinbestimmung übliche Diazoniumverbindung und

c) eine starke Säure.

3. Wässriges Reagens nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass das Detergens der allgemeinen Formel I in einer Konzentration von 0,25 -10% vorhanden ist.

4. Wässriges Reagens nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass das Detergens der allgemeinen Formel I in einer Konzentration von 1 - 3% vorhanden ist.

5. Wässriges Reagens nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die aromatische Aminoverbindung in einer Konzentration von 0,5-40 mM vorhanden ist.

6. Wässriges Reagens nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass die aromatische Aminoverbindung in einer Konzentration von 1-30 mM vorhanden ist.

7. Wässriges Reagens nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die starke Säure Amidoschwefelsäure ist.

8. Wässriges Reagens nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Amidoschwefelsäure in einer Konzentration von 0,025-1 M/l vorhanden ist und der pH des Reagens 1-3 ist.

9. Wässriges Reagens nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Amidoschwefelsäure in einer Konzentration von 0,10-0,25 M/l vorhanden ist und der pH des Reagens 1-3 ist.

10. Wässriges Reagens nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die starke Säure Salzsäure ist.

11. Wässriges Reagens nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Salzsäure in einer Konzentration von 0,01-0,5 M/l vorhanden ist und der pH des Reagens 1-3 ist.

12. Wässriges Reagens nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Salzsäure in einer Konzentration von 0,05-0,2 M/l vorhanden ist und der pH des Reagens 1-3 ist.

13. Wässriges Reagens nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die starke Säure Schwefelsäure ist.

14. Wässriges Reagens nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass die Schwefelsäure in einer Konzentration von 0,01-0,5 M/l vorhanden ist und der pH des Reagens 1-3 ist.

15. Wässriges Reagens nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass die Schwefelsäure in einer Konzentration von 0,05-0,25 M/l vorhanden ist und der pH des Reagens 1-3 ist.

16. Wässriges Reagens nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Diazoniumverbindung in einer Konzentration von 0,10-5,0 g/l vorhanden ist.

17. Wässriges Reagens nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass die Diazoniumverbindung in einer Konzentration von 0,15-3,0 g/l vorhanden ist.

18. Wässriges Reagens nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Nitritlösung in einer Konzentration von 4 -100 mM/l vorhanden ist.

19. Wässriges Reagens nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Substituenten R_3 und R_4 in der allgemeinen Formel I die gleiche Bedeutung haben.

20. Wässriges Reagens nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die aromatische Aminoverbindung 4-Aminobenzolsulfonsäure, 2,4- oder 2,5-Dichloranilin, 4-Nitroanilin, 2-Methoxy-4-nitroanilin oder 2-Methoxy-5-nitroanilin ist.

21. Wässriges Reagens nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Diazoniumverbindung diazotierte Aminobenzolsulfonsäure oder diazotiertes 2,4-oder 2,5-Dichloranilin oder diazotiertes 4-Nitroanilin oder 2-Methoxy-4-nitroanilin oder 2-Methoxy-5-nitroanilin ist.

22. Wässriges Reagens nach einem der Ansprüche 1-21, dadurch gekennzeichnet, dass das Detergens der allgemeinen Formel I N,N-Dimethyldecylamin ist.

23. Wässriges Reagens nach einem der Ansprüche 1-21, dadurch gekennzeichnet, dass das Detergens der Formel I N,N-Dimethyl-dodecylamin ist.

24. Wässriges Reagens nach einem der Ansprüche 1-21, dadurch gekennzeichnet, dass das Detergens der Formel I N,N-Dimethyl-tetradecylamin ist.

25. Wässriges Reagens nach einem der Ansprüche 1-21, dadurch gekennzeichnet, dass das Detergens der Formel I N,N-Dimethyl-hexadecylamin ist.

26. Wässriges Reagens nach einem der Ansprüche 1-21, dadurch gekennzeichnet, dass das Detergens der Formel I Didecyldimethylammoniumchlorid ist.

27. Wässriges Reagens nach einem der Ansprüche 1-21, dadurch gekennzeichnet, dass das Detergens der Formel I Dodecyltrimethylammoniumchlorid ist.

28. Wässriges Reagens nach einem der Ansprüche 1-21, dadurch gekennzeichnet, dass das Detergens der Formel I Dodecyltrimethylammoniumbromid ist.

29. Wässriges Reagens nach einem der Ansprüche 1-21, dadurch gekennzeichnet, dass das Detergens der Formel I Dodecyläthyldimethylammoniumbromid ist.

30. Wässriges Reagens nach einem der Ansprüche 1-21, dadurch gekennzeichnet, dass das Detergens der Formel I Dodecylpyridiniumchlorid ist.

31. Wässriges Reagens nach einem der Ansprüche 1-21, dadurch gekennzeichnet, dass das Detergens der Formel I Tetradecyltrimethylammoniumbromid ist.

32. Wässriges Reagens nach einem der Ansprüche 1-21, dadurch gekennzeichnet, dass das Detergens der Formel I N,N-Dimethyldodecylaminoxid ist.

33. Stabilisiertes und lyophylisiertes Reagens zur Bestimmung von Gesamt-Bilirubin in einer biologischen Probe enthaltend diazotierte Aminobenzolsulfonsäure, diazotiertes 4-Nitroanilin, 2-Methoxy-4-nitroanilin, 2-Methoxy-5-nitroanilin, 2,4-Dichloranilin oder 2,5-Dichloranilin, sowie ein oder mehrere Detergentien der allgemeinen Formel I gemäss Patentanspruch 1.

34. Reagens nach Anspruch 33, dadurch gekennzeichnet, dass das Detergens der allgemeinen Formal I N,N-Dimethyldodecylamin-oxid ist.

35. Reagens nach Anspruch 33, dadurch gekennzeichnet, dass das Detergens der allgemeinen Formel I N,N-Dimethyldodecylamin ist.

36. Reagens nach Anspruch 33, dadurch gekennzeichnet, dass das Detergens der allgemeinen Formel I Dodecyläthyldimethylammoniumbromid ist.

37. Reagens nach Anspruch 33, dadurch gekennzeichnet, dass das Detergens der allgemeinen Formel I Dodecyltrimethylammoniumbromid ist.

38. Reagens nach Anspruch 33, dadurch gekennzeichnet, dass das Detergens der allgemeinen Formel I Tetradecyltrimethylammoniumbromid ist.

39. Reagens nach Anspruch 33, dadurch gekennzeichnet, dass das Detergens der allgemeinen Formel I Dodecylpyridiniumchlorid ist.

40. Verfahren zur Bestimmung von Gesamt-Bilirubin in einer biologischen Probe nach der Diazo-Methode bei stark saurem pH, dadurch gekennzeichnet, dass ein oder mehrere Detergentien gemäss allgemeiner Formel I gemäss Anspruch 1 verwendet werden.

41. Verfahren zur Bestimmung von Gesamt-Bilirubin in einer biologischen Probe nach der Diazo-Methode bei stark saurem pH, dadurch gekennzeichnet, dass in oder mehrere Detergentien gemäss Ansprüchen 22-32 verwendet werden.

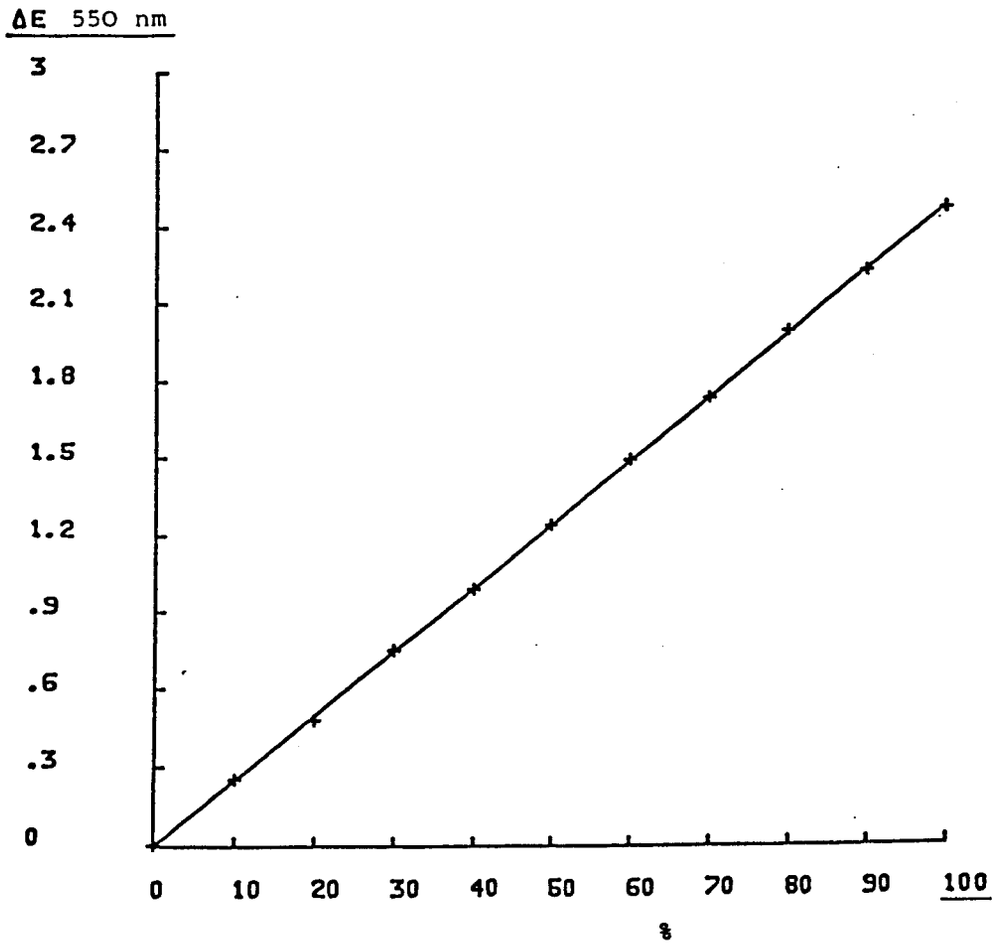
42. Verfahren zur Bestimmung von Gesamt-Bilirubin in einer biologischen Probe nach der Diazo-Methode bei stark saurem pH nach dem Auto-blanking-Verfahren, dadurch gekennzeichnet, dass ein oder mehrere Detergenzien der allgemeinen Formel I gemäss Anspruch 1 verwendet werden.

43. Verfahren zur Bestimmung von Gesamt-Bilirubin in einer biologischen Probe nach der Diazo-Methode bei stark saurem pH nach dem Auto-blanking-Verfahren, dadurch gekennzeichnet, dass ein oder mehrere Detergenzien gemäss Patentansprüchen 22-32 verwendet werden.

44. Verwendung eines Detergens der allgemeinen Formel I gemäss Anspruch 1 in einem Verfahren zur Bestimmung von Gesamt-Bilirubin nach der Diazo-Methode bei stark saurem pH in einer biologischen Probe.

45. Verwendung von einem oder mehreren Detergenzien gemäss Ansprüchen 22-32 in einem Verfahren zur Bestimmung von Gesamt-Bilirubin nach der Diazo-Methode bei stark saurem pH in einer biologischen Probe.

Abbildung 1



= 42,8 mg/dl
(732 µmol/l)

Kinetik bei Analysentyp 6

Abbildung 2

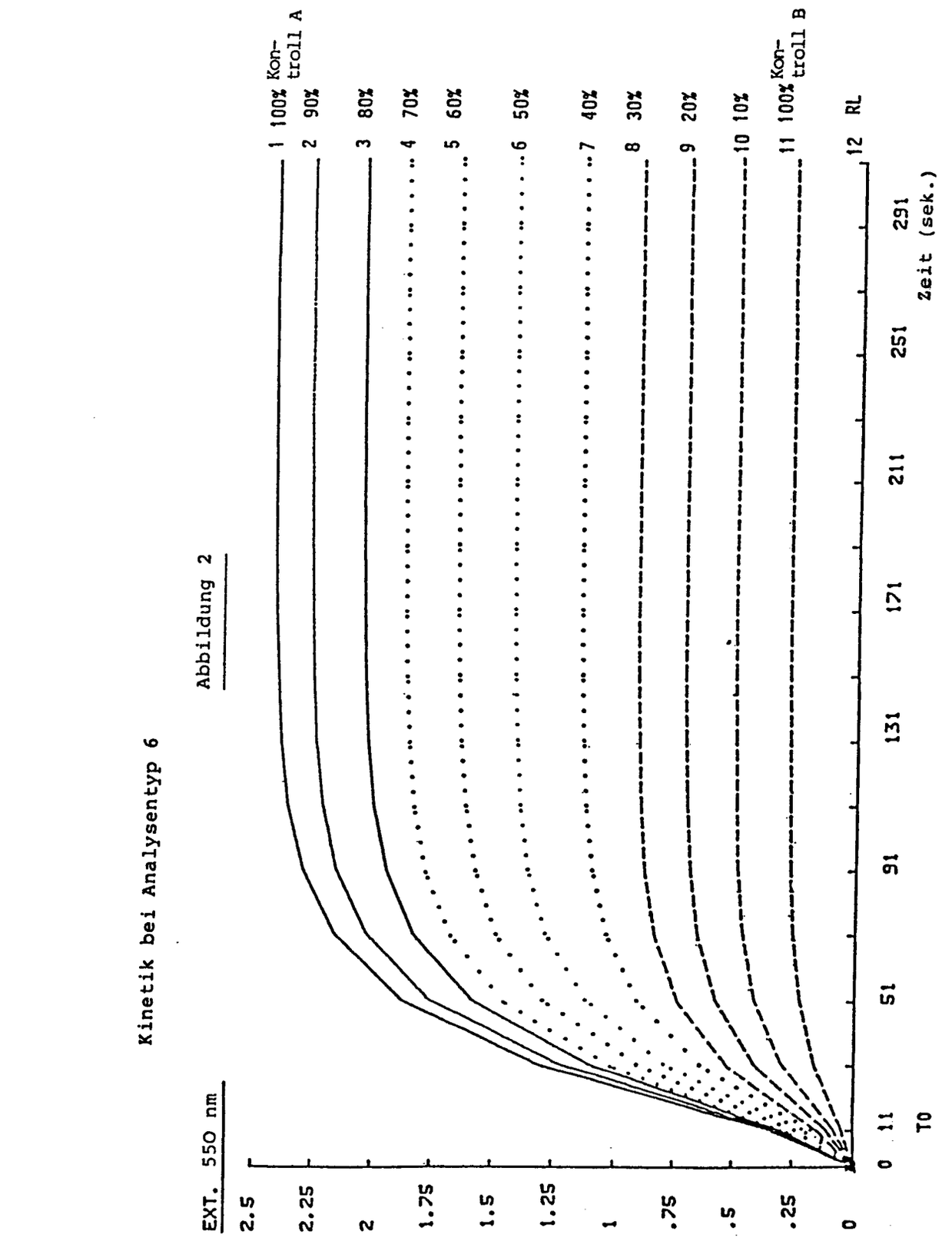


Abbildung 3

Manuelle Methode: Uebereinstimmung mit Kontrollseren

Kontrollseren	Erklärter Wert	Ergebnis
N <Roche> P 1833	1.2 - 1.4 - 1.6	1.50
P <Roche> E 0641	3.0 - 3.2 - 3.4	3.20
Moni-Trol I-E LTD 205	1.35- 1.46- 1.57	1.46
Moni-Trol II-E PTD 103	3.6 - 3.94- 4.3	4.10
Validate N 4993073	0.96- 1.20- 1.44	1.16
Validate A 4662033	3.40- 4.20- 5.00	4.54
BIC 969 R	18.6 -20.4 -22.2	20.20
Kontrollogen 613412	17.2 -20.2 -23.2	19.40

Kinetik bei Analysentyp 5 Abbildung 4

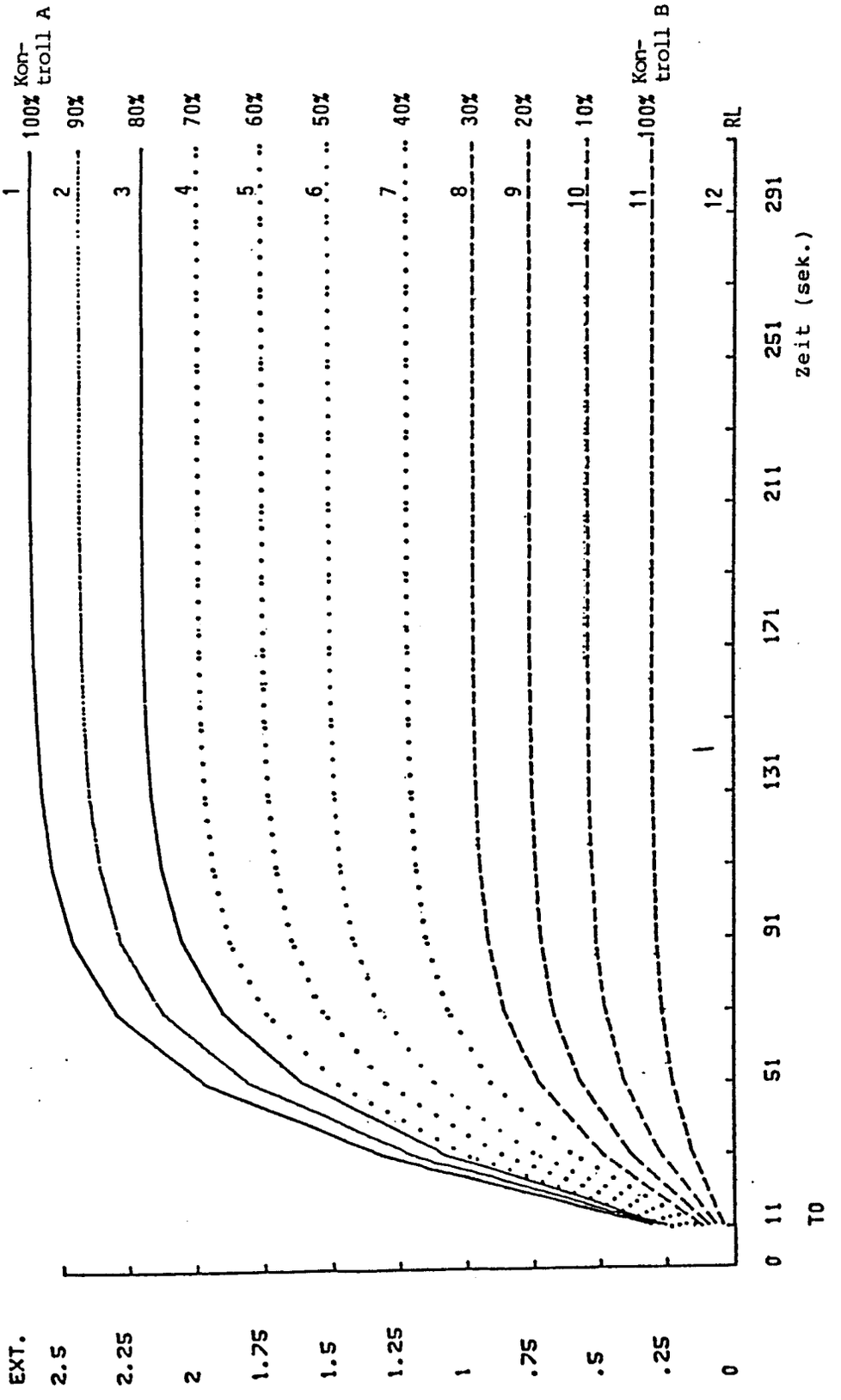


Abbildung 5

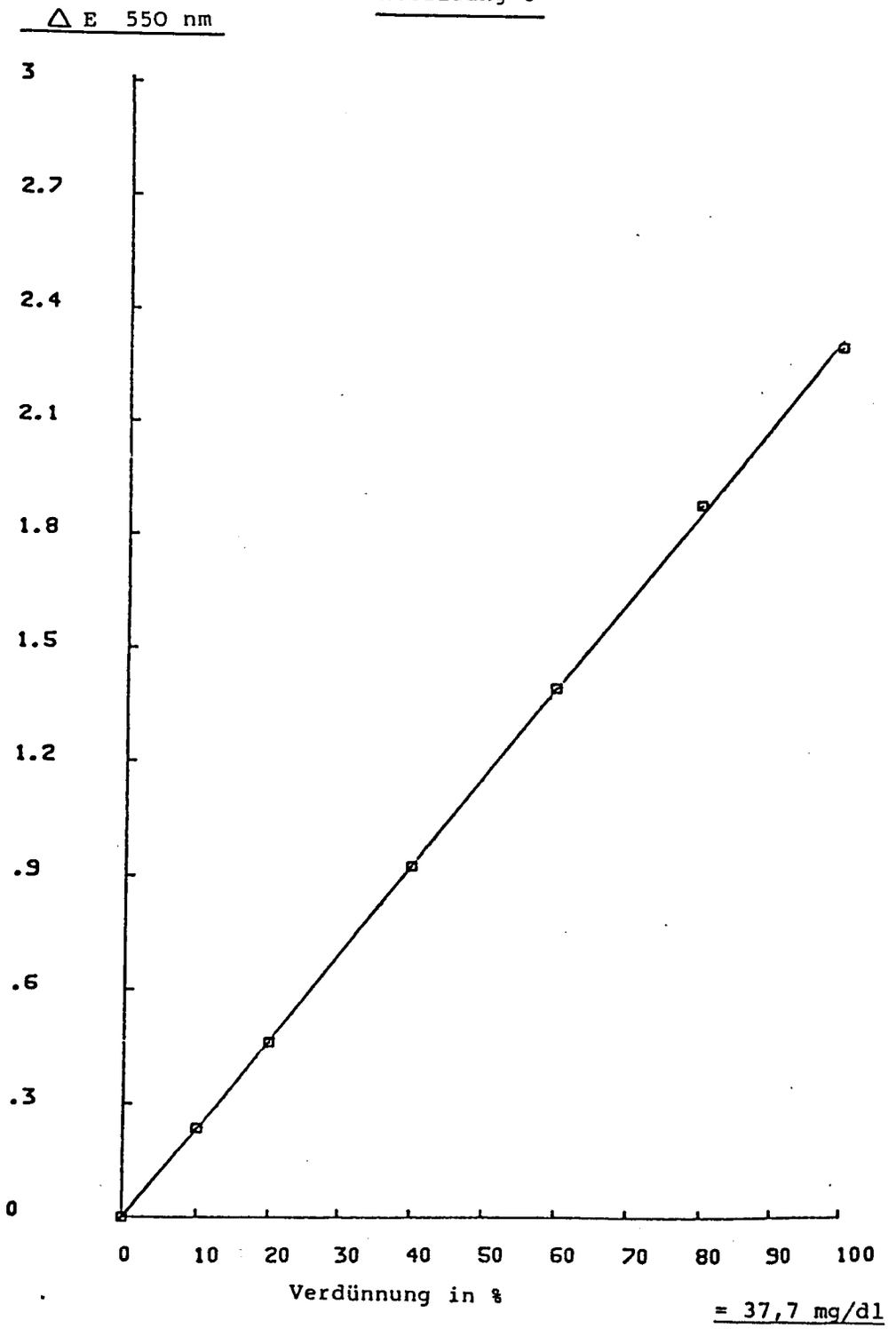
Recovery-Studie

		erklärter Wert µmol/l	gemessener Wert µmol/l	Recovery %
1. Kontrollogen Bilirubin Lot A613413A + Sigma Standardset 34F6094				
100 %	0 %	365.9	362.9	99.2
80 %	20 %	326.9	323.5	99.0
60 %	40 %	287.9	286.6	99.5
40 %	60 %	248.9	248.3	99.8
20 %	80 %	209.9	211.1	100.5
0 %	100 %	171.0	176.0	102.9
				Mittel: 100.1%
2. ⟨Roche⟩ N, Lot P1039	+ Sigma Standardset 34F6094			
0 %	100 %	171.0	174.4	101.9
20 %	80 %	141.9	144.0	101.4
40 %	60 %	111.8	112.8	100.9
60 %	40 %	82.3	82.6	100.3
80 %	20 %	52.7	53.0	100.5
100 %	0 %	23.1	23.9	101.7
				Mittel: 101.1%

0 217 197

(Diazotiertes 2,4-Dichloranilin)

Abbildung 6



= 37,7 mg/dl